

UNIVERSITÉ DE GENEVE

Département de morphologie

Histologie et embryologie

Département de biologie animale,
anatomie et physiologie comparées

FACULTE DES SCIENCES

Professeur L. ORCI

Professeur H. J. HUGGEL

**MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALES DU PANCREAS
ENDOCRINE CHEZ DES RONGEURS ATTEINTS
DE TROUBLES DU METABOLISME GLUCIDIQUE**

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Marie-Hélène AMHERDT

de

GLIS (Valais)

Texte condensé de la thèse No 1645, approuvée par la Faculté des sciences. Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse N° 1645

GENEVE

Editions Médecine et Hygiène

1974

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de morphologie

Histologie et embryologie

Département de biologie animale,

anatomie et physiologie comparées

FACULTE DES SCIENCES

Professeur L. ORCI

Professeur H. J. HUGGEL

**MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALES DU PANCREAS
ENDOCRINE CHEZ DES RONGEURS ATTEINTS
DE TROUBLES DU METABOLISME GLUCIDIQUE**

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Marie-Hélène AMHERDT

de

GLIS (Valais)

Texte condensé de la thèse No 1645, approuvée par la Faculté des sciences. Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1645

GENEVE

Editions Médecine et Hygiène

1974

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur L. Orci, directeur scientifique, H. Huggel, rapporteur devant la Faculté et d'une Commission composée de Messieurs A.E. Renold (Faculté de médecine) et A. Perrelet (Faculté de médecine), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 13 mars 1974

Le doyen :
Jean Muller

Thèse No 1645



Qu'il me soit permis de rendre ici hommage à la mémoire du professeur Charles Rouiller, sous l'égide duquel j'ai eu la chance d'entreprendre ce travail.

J'exprime ma vive gratitude au professeur Lelio Orci qui m'a dirigée et conseillée tout au long de mes recherches ainsi qu'aux professeurs H.J. Huggel et A. Perrelet qui n'ont ménagé pour moi ni leur temps, ni leur savoir.

Ma gratitude va également aux professeurs A.E. Renold et W. Stauffacher pour m'avoir offert constamment le support et l'hospitalité intellectuelle de l'Institut de Biochimie clinique, ainsi qu'à Monsieur R. Cuche, responsable du maintien des colonies de rongeurs sur lesquels ce travail a été effectué.

Enfin, je remercie chaleureusement Madame Sidler, Mesdemoiselles Nagy et Bernard, et Messieurs Mira et Bernard, sans lesquels cet ouvrage n'aurait pu se concrétiser.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide du Fonds
National Suisse de la Recherche Scientifique (Fonds
No 3.8080.72 et 3.0310.73).



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	2
<u>RESULTATS</u>	5
<u>Généralités sur les îlots de Langerhans</u>	
Microscopie optique	5
Microscopie électronique	6
<u>Altérations morphologiques des îlots chez les animaux hyperglycémiques</u>	
Hyperplasie des îlots	6
Infiltration de glycogène	8
Innervation	8
<u>Changements morphologiques des organites cellulaires engagés dans les différentes étapes du cycle sécrétoire de la cellule B</u>	9
Réticulum endoplasmique granulaire (REG)	10
Golgi	13
Granules	13
Microtubules	14
Emiocytose (exocytose)	15
Couplage Exo-endocytose	16
Membrane plasmique	17
<u>DISCUSSION</u>	18
<u>RESUME</u>	25
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	28
<u>FIGURES ET TABLEAU</u>	35

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, l'intérêt pour les petits rongeurs comme modèles de l'étiologie et de la pathogenèse du diabète s'est grandement accru, d'une part parce que le diabète de ces mammifères présente certaines similitudes avec le diabète humain, d'autre part parce qu'il est possible, pour les rongeurs maintenus en laboratoire, de contrôler efficacement des facteurs tels que l'hérédité et l'environnement.

Dans le cadre d'un large programme d'étude entrepris en collaboration avec l'Institut de Biochimie Clinique de l'Université de Genève et portant sur des rongeurs spontanément diabétiques ou rendus diabétiques expérimentalement, il nous a été possible d'examiner en microscopie électronique le pancréas d'un grand nombre de ces animaux.

Le rôle du pancréas endocrine dans la genèse du diabète est connu depuis longtemps. On sait que les cellules B des îlots de Langerhans sécrètent l'insuline et que lorsque cette hormone vient à manquer ou n'est plus mise à la disposition des tissus en quantité suffisante, il en résulte de graves troubles du métabolisme des hydrates de carbone.

Les mécanismes de synthèse et de sécrétion de l'insuline font actuellement l'objet d'études détaillées et des modèles de sécrétion sont constamment remaniés et améliorés grâce au développement des techniques d'exploration (1-4).

Ce travail a été entrepris dans le but :

1. de comparer les altérations morphologiques pancréatiques chez différentes espèces de rongeurs souffrant de troubles du métabolisme des hydrates de carbone;
2. de localiser des modifications éventuelles du cycle sécrétoire des cellules B chez ces animaux.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

Parmi les rongeurs spontanément diabétiques, nous avons pu étudier les animaux suivants :

1. Acomys cahirinus (ou souris à piquants) de tout âge, faisant partie de la colonie élevée à Genève depuis 1964.
2. Souris obob (C57-B1/6-ob/ob) et leurs contrôles (C57-B1/6-J) venant du laboratoire de Jackson, Bar Harbor (Maine), U.S.A.
3. Souris DBM et leurs contrôles (C57-B1/6-+/+) provenant de la colonie de l'Institut de Biochimie Clinique à Genève.
4. Hamsters chinois contrôles et cétosiques envoyés à Genève par le Dr W.E. Dulin de la "Upjohn Company", Kalamazoo, Michigan, U.S.A.
5. Mulots diabétiques donnés par Melle Schenk de l'Institut de Physiologie de Lausanne (Dir. Prof. Dolivo).

Pour l'étude du diabète expérimental, nous avons utilisé des rats Wistar auxquels on a administré différentes substances, telles que :

1. Streptozotocine : un antibiotique à effet diabétogène (5) et beta-cytotoxique (6) administré par voie intrapéritonéale à différentes concentrations.
2. Cyproheptadine (CPH) : un composé antisérotonine-antihistamine (7) produisant des lésions réversibles au niveau des îlots de Langerhans et une intolérance au glucose seulement chez le rat (8,9). La CPH a été administrée par voie buccale à raison de 45 mg/kg, 1 fois par jour, ceci pendant 8, 16, 20 et 40 jours.

METHODES

Microscopie électronique conventionnelle

La partie moyenne ou caudale du pancréas des animaux sacrifiés par décapitation a été divisée en petits fragments et ceux-ci immergés dans une solution de glutaraldehyde à 2, 4 ou 6% dans un tampon phosphate à 0.1 M. Après lavage dans le même tampon phosphate, ces fragments sont ensuite post-fixés dans une solution de tétroxyde d'osmium à 1 ou 2% tamponné au phosphate, deshydratés puis enrobés dans l'Epon 812. Les îlots de Langerhans sont repérés sur des coupes semi-fines observées en microscopie optique puis coupés en coupes ultrafines à l'aide de couteaux de verre ou de diamant. Les coupes ont ensuite été recueillies sur des grilles de cuivre de 150 mesh, puis contrastées soit par une simple coloration au citrate de plomb, soit par une double coloration à l'acétate d'uranyle et au plomb. Les grilles ont ensuite été examinées au microscope électronique (Zeiss EM 9 ou Philips EM 300).

Ilots isolés

Les îlots ont été isolés de fragments du pancréas par une digestion à la collagénase (10), incubés dans divers milieux selon l'expérience, puis fixés, enrobés et coupés comme indiqué plus haut.

Histochimie

La localisation de la phosphatase acide dans le pancréas endocrine a été faite d'après le procédé de Gomori, modifié par BARKA et ANDERSON (11).

La peroxydase de raifort a été dissoute dans le milieu d'incubation des îlots isolés. La révélation de cette peroxydase a été faite selon la méthode de GRAHAM et KARNOVSKY (12).

Cryodécapage

Le cryodécapage a été effectué d'après le procédé de MOOR et coll. (13,14), en utilisant une unité Balzers BAF 301.

Morphométrie

Les études quantitatives des densités de volume ou de surface ont été faites en appliquant les méthodes morphométriques établies par WEIBEL (15).

Radioautographie

Les expériences radioautographiques de type "pulse-chase" ont été effectuées sur des îlots isolés : les îlots ont été exposés à 300 ou 400 microcuries de leucine tritiée (4,5-H³) pendant 2 ou 5 minutes, puis lavés 4 fois avec un milieu d'incubation contenant un excès de leucine non radioactive (5mM). Le "chasing" de la radioactivité a été fait en ajoutant de la leucine non radioactive pendant 5, 10, 30, 60, 90 ou 120 minutes au milieu d'incubation. Une émulsion Ilford L₄ a été posée sur des coupes ultrafines d'après le procédé décrit par CARO (16). Après une exposition de 4 semaines les émulsions ont été développées soit par un procédé chimique, soit par un procédé "physique".

Calculs statistiques

Pour chaque paramètre quantifié, qu'il s'agisse de morphométrie, de radioautographie ou de l'évaluation du nombre de

particules sur les membranes, nous avons calculé la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM). Pour la comparaison de différents groupes, le "t" test de Student a été appliqué, et deux moyennes ont été considérées significativement différentes si la probabilité "p" était plus petite que 0,01.

RESULTATS

GENERALITES SUR LES ILOTS DE LANGERHANS

Microscopie optique

La partie endocrine du pancréas se présente chez les rongeurs et chez la plupart des mammifères sous forme de petits groupes de cellules claires éparpillés dans le parenchyme exocrine. Ce sont les îlots de Langerhans. La forme, la taille et le nombre des îlots sont sujets à de grandes variations mais dans tous les cas leur masse totale est très faible puisqu'elle ne représente en moyenne que le 1% du pancréas. Chez la plupart des rongeurs, l'îlot de Langerhans est séparé du tissu exocrine par des formations conjonctives péri-insulaires. Il est richement irrigué par un réseau de capillaires et reçoit de nombreuses fibres amyéliniques qui se terminent directement au contact des cellules endocrines.

On admet actuellement l'existence d'au moins 4 types cellulaires dans les îlots des rongeurs : la cellule B qui sécrète l'insuline, la cellule A (ou A₂) responsable de la formation du glucagon, la cellule D (ou A₁) source probable de la gastrine et la cellule à sérotonine.

La topographie de ces différents types cellulaires dans l'îlot est variable. Classiquement, chez les rongeurs, les cellules A se trouvent à la périphérie de l'îlot. Les cellules D sont souvent mêlées aux A, mais leur situation périphérique est moins constante. Les cellules B forment la masse centrale, alors que les cellules à sérotonine, ne semblent pas avoir de localisation préférentielle.

Microscopie électronique

En microscopie électronique, ces 4 différents types de cellules peuvent facilement être identifiés par l'aspect de leurs granules sécrétoires. Les cellules A, D et les cellules à sérotonine ont chacune une population morphologiquement homogène de granules, alors que les cellules B possèdent des granules sécrétoires d'aspects très différents (aspects que nous étudierons plus en détail par la suite).

Ces 4 types cellulaires ont été observés chez tous les rongeurs que nous avons examinés. Dans ce travail nous ne décrirons que les cellules responsables de la sécrétion de l'insuline, les cellules B.

ALTERATIONS MORPHOLOGIQUES DES ILOTS CHEZ LES ANIMAUX HYPER-GLYCEMIQUES

(L'ensemble des variations morphologiques décrites dans ce chapitre est résumé dans un tableau récapitulatif, à la page 38).

Hyperplasie des îlots

Tous les rongeurs spontanément diabétiques présentent un syndrome qui, au cours de sa phase précoce est caractérisé par une hyperinsulinémie de degré variable et qui peut dans certains

cas précéder l'hyperglycémie. Quelle que soit la cause de cette hyperinsulinémie (hyperphagie, diminution de l'exercice, résistance des tissus à l'insuline), celle-ci est toujours accompagnée d'une hyperplasie insulaire. Cette hyperplasie peut être minime et extrêmement éphémère chez les animaux dont le syndrome diabétique évolue rapidement (souris DBM et hamster chinois); elle est plus marquée chez les animaux dont le syndrome évolue sans une déficience absolue en insuline (comme la souris obob). L'Acomys représente une exception. Ces animaux, dont le syndrome diabétique commence aussi par une phase hyperinsulinémique, présentent une hyperplasie insulaire beaucoup plus importante que les autres rongeurs diabétiques (le tissu endocrine peut représenter 15% du pancréas au lieu de 1%) (17). Cette hyperplasie se rencontre aussi bien chez les animaux normoglycémiques que chez les hyperglycémiques*.

Parmi les différents mécanismes responsables de l'hyperplasie des flots, nous en avons observé deux :

- a) la division par mitose de cellules B préexistantes chez les souris DBM. Ce phénomène a été décrit dans la lignée parentale de ces souris (19,20),
- b) la prolifération de cellules mixtes, constatée principalement chez l'Acomys (21,22). La cellule mixte exocrine-endocrine B est située généralement en périphérie de l'îlot; la partie exocrine et la partie endocrine de son cytoplasme sont parfois bien séparées, parfois intimement mêlées.

* Ces observations ont été faites chez les Acomys de la colonie de Genève et il est intéressant de noter que les Acomys prélevés dans leur habitat naturel (régions semi-désertiques d'Israël) ne présentent pas cette hyperplasie (18).

Infiltration de glycogène

Des dépôts de glycogène sont rarement observés dans les cellules B des souris obèses et des souris DBM, même si leur glycémie est très élevée. En revanche, les cellules B du rat, de l'Acomys, du mulot et du hamster chinois stockent immédiatement du glycogène si leur glycémie s'élève.

Chez l'Acomys et le hamster chinois particulièrement, les cellules B peuvent accumuler des quantités énormes de glycogène lorsque l'hyperglycémie est sévère. Même à un stade extrême du stockage, certaines zones semblent être épargnées de l'invasion de glycogène : l'aire du Golgi (23) et une bande cytoplasmique de structure filamenteuse située sous la membrane plasmique et sous la membrane nucléaire.

Les organites cytoplasmiques, bien que déplacés gardent une apparence à peu près normale à l'exception des citernes du REG qui peuvent prendre l'aspect d'empreintes digitales.

Apparemment les dépôts de glycogène n'altèrent pas irréversiblement la cellule B et disparaissent lorsque la glycémie redevient normale après une thérapie à l'insuline (24).

Innervation

Les techniques d'imprégnation à l'argent ont montré en microscopie optique qu'il y a de nombreux nerfs dans le pancréas. Quoique la plupart des nerfs soient associés aux gros vaisseaux sanguins, quelques uns se ramifient dans le parenchyme en longeant les capillaires et se terminent au niveau des cellules endocrines. La microscopie électronique a rendu possible la distinction entre terminaisons adrénér- giques et cholinergiques (25). La présence de vésicules dans les terminaisons nerveuses suggère que le mécanisme de transmission est essentiellement chimique. L'utilisation de traceurs de l'espace extracellulaire dans les flots a cependant montré

qu'il existe aussi des "gap junctions" entre terminaisons nerveuses et cellules insulaires. Les "gap junctions" représentent le substrat morphologique pour une transmission électrique (26).

Tous les rongeurs que nous avons étudié possèdent des terminaisons nerveuses excepté l'Acomys. Chez cet animal, du fœtus à l'individu âgé de 3 ans et plus, qu'il soit normoglycémique, hyperglycémique ou cétosique, nous n'avons pas trouvé une seule terminaison nerveuse.

Le rôle exact de l'innervation dans la physiologie normale des îlots est mal connu et les résultats expérimentaux cherchant à démontrer une influence nerveuse sur la sécrétion hormonale sont souvent contradictoires (27-29). Si les terminaisons nerveuses dans les îlots pancréatiques n'activent peut-être pas directement les mécanismes sécrétoires, il est cependant possible qu'ils puissent moduler d'une certaine façon la sensibilité des cellules aux stimuli hormonaux.

CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES DES ORGANITES CELLULAIRES ENGAGÉS DANS LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DU CYCLE SÉCRETOIRE DE LA CELLULE B.

La séquence d'évènements qui permettent la synthèse, la concentration, le stockage et la libération de l'insuline, est maintenant assez bien comprise grâce aux recherches de ces dernières années conduites principalement par LACY (3,4,30), ORCI (2,31,32) et MALAISSE (33,34).

Les acides aminés (dont une séquence spécifique composera la molécule de pro-insuline, puis d'insuline) sont assemblés au niveau des ribosomes, eux-mêmes attachés à la face externe des citernes du réticulum endoplasmique (REG).

La chaîne de polypeptides est ensuite libérée dans la lumière de la citerne puis acheminée le long des citernes vers la région du Golgi. Du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi, le passage des protéines se fait par l'intermédiaire de petites vésicules qui bourgeonnent de la paroi des citernes ergastoplasmiques. Au niveau du complexe de Golgi, le produit est concentré progressivement du pôle convexe au pôle concave, où il se trouve entouré d'une membrane limitante, dérivée des citernes golgiennes. Les granules de sécrétion s'éparpillent ensuite dans le cytoplasme et sont stockés jusqu'à leur libération.

La libération de l'insuline se fait vraisemblablement par émiocytose ou exocytose. Ce mode de libération est le résultat de l'interaction de diverses structures cytoplasmiques : le granule sécrétoire, les microtubules, la membrane cellulaire, ainsi que la bande cytoplasmique filamenteuse qui lui est immédiatement sous-jacente. Il se déroule selon une séquence bien précise : les grains de sécrétion migrent le long des microtubules jusqu'à ce qu'ils atteignent la zone filamenteuse sous-plasmalemmale. Après avoir franchi cette zone, qui pourrait moduler leur passage, les granules arrivent au contact de la membrane plasmique. La membrane du granule et la membrane cellulaire fusionnent créant ainsi une ouverture par laquelle le contenu sécrétoire est déchargé dans l'espace extracellulaire.

Réticulum endoplasmique granulaire (REG)

Le REG est un organite composé de citernes limitées par une membrane à laquelle sont attachés des ribosomes. Le REG a pour origine l'enveloppe nucléaire, et comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, c'est un lieu de synthèse protéique. Le développement de cet organite peut donc généralement servir d'index de la synthèse protéique. Dans les

cellules B des rongeurs hyperglycémiques, le REG est habituellement étendu et bien développé. De plus, des changements qui consistent en une dilatation des citernes dans lesquelles un matériel pâle et amorphe est stocké ont été observés chez des souris DBM hyperglycémiques et chez des rats traités à la cyproheptadine. Ces dilatations s'accompagnant souvent d'une perte des ribosomes, il nous a paru opportun d'étudier la capacité fonctionnelle du réticulum endoplasmique par la radioautographie.

Dans ces expériences, des flots ont été isolés à partir de rats contrôles (C), de rats traités à la cyproheptadine pendant 15 jours (CPH), et de rats ayant reçu deux injections d'HB 419* pendant 2 jours (SH). Ces derniers peuvent être considérés comme contrôles additionnels, car leurs cellules B sont dégranulées au même point que celles de rats traités à la CPH mais elles ne montrent aucune altération morphologique du REG.

Les flots isolés de ces trois groupes d'animaux ont été exposés pendant 5 minutes à de la leucine tritiée, puis incubés en présence de leucine non radioactive pendant 10, 25, 55 et 85 minutes. A la fin de l'expérience nous avons comparé dans ces trois groupes la radioactivité présente dans le REG, l'appareil de Golgi et les grains de sécrétion (Fig. I).

La courbe générale de l'incorporation de la radioactivité est à peu près la même pour les trois groupes et elle est comparable aux résultats reportés par HOWELL et coll. (35) pour les cellules B d'flots isolés de rats témoins ou à nos propres déterminations effectuées sur des organo-

* Sulfamidé hypoglycémiant qui stimule, aux doses utilisées, (31) la sécrétion d'insuline.

cultures de pancréas de rat foetal (1,36). Cette parfaite concordance entre les trois groupes est inattendue lorsqu'on se remémore les altérations morphologiques marquées du REG chez le groupe CPH. Ceci nous a incité à évaluer de façon plus précise l'incorporation de la radioactivité dans le REG. Dans ce but, la radioactivité a été exprimée non plus de façon relative mais en fonction de l'unité de volume, c'est-à-dire en tenant compte de la dilatation des citernes du REG causée par le traitement à la CPH.

Dans une première étape, la densité de volume (Vv) du REG dans l'unité cytoplasmique a été évaluée par morphométrie, donnant les valeurs suivantes :

$$\begin{array}{ccc} \text{SH : } 0,613 \pm 0,012 & \text{C : } 0,576 \pm 0,021 & \text{CPH : } 0,821 \pm 0,028 \\ \hline \text{NS} & \text{p} < 0,005 & \end{array}$$

p < 0,025

NS = non significatif

Dans une seconde étape, nous avons compté le nombre de grains radioautographiques qui se trouvaient sur le compartiment mesuré :

$$\begin{array}{ccc} \text{SH : } 66 \pm 4,0 & \text{C : } 64 \pm 6,2 & \text{CPH : } 76 \pm 9,7 \\ \hline \text{NS} & \text{NS} & \end{array}$$

NS

Enfin, le nombre de grains radioautographiques trouvés sur le REG a été divisé par le volume qu'occupe le REG dans l'unité cytoplasmique et ces valeurs rapportées en % par rapport au contrôle :

$$\begin{array}{ccc} \text{SH : } 96\% \pm 3,2 & \text{C : } 100\% \pm 3,7 & \text{CPH : } 83\% \pm 4,8 \\ \hline \text{NS} & \text{p} < 0,001 & \end{array}$$

p < 0,005

Par cette méthode, on peut donc mettre en évidence une diminution significative de la radioactivité dans le compartiment REG des cellules B de rats traités à la CPH.

Golgi

C'est dans le complexe de Golgi qu'a lieu la formation et la maturation des grains de sécrétion (31,35-38).

Dans une cellule en pleine activité sécrétoire, ce qui est le cas d'une cellule B d'un animal diabétique, le Golgi est bien développé et on peut y trouver couramment des granules en formation.

Dans les cellules B de rats traités à la CPH, l'appareil de Golgi est de même bien développé. La radioactivité présente dans l'appareil de Golgi à un temps donné après le "pulse" est comparable chez les rats CPH, les rats contrôles et les rats SH (Fig. I). La radioactivité présente dans les granules sécrétoires est également comparable pour ces trois groupes d'animaux (Fig. I). Cependant les granules sécrétoires marqués stationnent plus longtemps dans l'aire du Golgi chez les animaux traités à la CPH que chez les contrôles ou les rats traités au SH (Fig. II).

Granules

Les granules beta des rongeurs se présentent sous 3 formes distinctes :

- a) Les granules dont le contenu est arrondi, dense aux électrons et nettement séparé de la membrane limitante par un halo clair.
- b) Les granules dont le contenu a une forme angulaire ou en barre.
- c) Les granules dits "pâles" qui sont peu denses aux électrons et dont le contenu n'est pas séparé par un halo clair de la membrane limitante.

Ces trois types granulaires sont identifiables chez tous les rongeurs (diabétiques ou non) que nous avons étudiés, mais en proportion différente.

Par exemple, l'*Acomys* se distingue des autres rongeurs par le fait que dans la grande majorité des cellules B, les granules pâles prédominent (21).

Microtubules

Les microtubules ont une structure cylindrique et mesurent environ 20 à 25 nm de diamètre. Ils ont été impliqués dans les processus de libération d'insuline (30,31). En effet, ils pourraient contrôler, en synergie avec les microfilaments, la migration des grains de sécrétion depuis la zone du Golgi vers la membrane plasmatisque, préluant à l'émicytose (32,33). La vincristine en incubation prolongée sur des îlots isolés de rat provoque la disparition des microtubules dans la cellule B et la précipitation des protéines tubulaires sous forme de dépôts cristalloïdes. En même temps elle diminue la sécrétion d'insuline induite par le glucose (34).

Chez les rongeurs que nous avons étudié, nous avons observé des microtubules dans les cellules B de chaque espèce, mais avec une fréquence extrêmement variable. Comme il est difficile d'évaluer quantitativement une structure qui n'est aisément reconnaissable que lorsque l'angle de la coupe ultrafine est favorable, nous n'avons pas compté directement les microtubules dans les cellules B mais nous avons évalué le nombre des dépôts cristalloïdes dus à la précipitation des protéines microtubulaires par la vincristine. En effet, il semble exister une relation directe entre la quantité totale de protéines microtubulaires et le nombre des cristaux précipités par la vincristine (39-41).

Dans cette expérience, nous avons utilisé trois espèces d'animaux contrôles (rats Wistar, souris suisses et souris C57 B1/6 +/+) et deux sortes de rongeurs à tendance diabétique, les Acomys et les souris DBM, elles-mêmes subdivisées en normoglycémiques et hyperglycémiques. Tous les flots ont été traités de manière identique, c'est-à-dire incubés pendant 3 heures dans un milieu contenant de la vincristine. Cinq flots par espèce ont été étudiés et la figure III montre le nombre de cellules B contenant des cristaux en % du nombre de cellules B présentes dans le même flot.

D'après cette figure, il ressort que le nombre de cellules B contenant des cristaux est à peu près le même chez les deux groupes de souris témoins et un peu plus élevé chez les rats normaux. Parmi les rongeurs à tendance diabétique, la souris DBM normoglycémique est comparable aux souris témoins; chez la souris hyperglycémique la fréquence de cristaux est légèrement plus élevée. Chez l'Acomys en revanche, le nombre de cellules B contenant des cristaux est très bas (presque 10 fois moins que chez les souris contrôles); les cristaux eux-mêmes sont généralement plus petits et leur périodicité beaucoup moins apparente.

Emiocytose (exocytose)

Ce mode de sécrétion a été décrit pour la première fois dans le pancréas (42) et ensuite dans d'autres glandes endocrines. Comme nous l'avons dit auparavant, l'émioctose se fait par la fusion de la membrane granulaire avec la membrane plasmique, permettant la libération du contenu granulaire dans l'espace extracellulaire. Il faut noter cependant que des images nettes d'émioctose sont en général rarement observées sur coupe ultrafine et que le cryodécapage, technique permettant de révéler de larges surfaces de membranes cellulaires, a

permis de corrélér de façon non-ambiguë l'augmentation de la sécrétion d'insuline avec une augmentation des images morphologiques d'émioctose (43).

Couplage Exo-endocytose

Comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, la libération d'insuline par émioctose (exocytose) implique l'incorporation de la membrane du granule à la membrane plasmique. Pour que ces additions répétées de membranes ne produisent pas d'augmentation de la surface cellulaire, nous avons pensé que la cellule B doit être capable également d'incorporer des fragments de membrane plasmique par un mécanisme inverse de l'exocytose, c'est-à-dire par endocytose. Pour tester cette hypothèse, nous avons incubé des flots isolés pendant une heure en présence de peroxydase avec (300 mg%) et sans glucose. Si l'hypothèse d'un couplage entre l'exocytose et l'endocytose est correcte, toute stimulation de l'exocytose (glucose élevé) devrait s'accompagner d'une augmentation parallèle de l'endocytose, elle-même détectée par la peroxydase. En effet, la peroxydase qui peut se révéler histochimiquement comme un précipité électron-dense, marquera non seulement l'espace extracellulaire mais également toute vacuole intracytoplasmique si cette dernière résulte de l'invagination de la membrane plasmique (endocytose) ayant incorporé une parcelle d'espace extracellulaire. Nous avons quantifié ce phénomène par la morphométrie à l'aide de la formule suivante :

$$S_v = \frac{I_i}{P_c \cdot g^2 \cdot d}$$

où S_v représente la densité de surface,

I_i les intersections du réseau de morphométrie tombant sur

des vésicules contenant de la peroxydase, Pc les intersections tombant sur le cytoplasme, et g^2 et d des facteurs de grossissement et de calibrage.

Après une incubation de 60' avec de la peroxydase, les résultats sont les suivants :

<u>Conc. de glucose dans le milieu</u>	<u>Densité de surface des vésicules contenant de la peroxydase</u>	
0 mg%	$0,135 \pm 0,020$ (9)	P < 0,0005
300 mg%	$0,429 \pm 0,026$ (9)	

L'activité endocytotique est donc trois fois plus grande en présence de glucose qu'en son absence et l'hypothèse du couplage de l'endocytose avec l'émiocytose se trouve vérifiée (44).

Membrane plasmique

Les membranes des cellules B de certains rongeurs ont été étudiées avec la technique du cryodécapage. Cette technique permet en effet de révéler la structure interne des membranes et montre que celles-ci contiennent des particules représentant probablement les protéines membranaires. Le nombre ou la répartition de ces particules a une signification fonctionnelle (45-47).

Depuis les travaux de COOPERSTEIN et WATKINS (48,49) étudiant l'effet de l'alloxane sur la perméabilité des cellules insulaires, on sait que le lieu d'action primaire de cette substance est la membrane de la cellule B. L'alloxane et la streptozotocine produisent des lésions et des nécroses des cellules entre 4 et 10 heures après l'injection. Alors qu'il est impossible de mettre en évidence, en microscopie électronique conventionnelle, une modification des cellules B

dans les stades précoces de l'intoxication, le cryodécapage permet d'observer une diminution importante et significative du nombre de particules dans la membrane 10 minutes après l'injection de doses diabétogènes d'alloxane (200 mg/kg) et 90 minutes après une injection de streptozotocine (150 mg/kg) à des *Acomys* normoglycémiques. En effet, si chez les contrôles on trouve $2,297 \pm 59$ particules par μ^2 de surface membranaire, on en trouve plus que 702 ± 45 après l'alloxane et 913 ± 90 après la streptozotocine. Cette réduction numérique s'accompagne généralement d'une distribution irrégulière des particules (50).

DISCUSSION

Selon STAUFFACHER (51,52), RENOLD (53) et CAMERON (54,55), les syndromes diabétiques des rongeurs peuvent être divisés en 3 groupes (groupes A,B,C). Pour tous les groupes, l'insuline endogène serait relativement inefficace au cours de la première phase de l'évolution du syndrome. Le pancréas répondrait alors à cette déficience relative par une augmentation de la sécrétion d'insuline. Chez les animaux du groupe A, le pancréas semble capable de faire face à la demande accrue d'insuline par une hyperplasie des îlots et le syndrome ne comporte qu'une hyperglycémie relativement stable (souris obob et certains *Acomys*). Par contre, chez les animaux dont le syndrome évolue vers l'acidocétose (groupes B et C) le pancréas semble soit incapable de s'adapter en augmentant le nombre de cellules B fonctionnelles (hamster chinois), soit seulement capable de répondre temporairement au stimulus accru par une hyperplasie des îlots (*Acomys*) ou par la mitose de ces cellules B (souris DBM).

La souris obèse (obob)

Du point de vue morphologique, les cellules B des souris obob sont fréquemment dégranulées et montrent tous les signes cytologiques d'une sécrétion active d'insuline (REG fortement développé et Golgi étendu). Ceci correspond parfaitement aux observations biochimiques qui montrent une libération d'insuline constamment excessive mais cinétiquement normale (56).

L'unique changement morphologique que l'on ait observé dans le pancréas de ce rongeur, en dehors de la dégranulation des cellules B, est l'élargissement focal des espaces intercellulaires. Il est difficile de donner une signification précise à cette observation. L'étude de l'ultrastructure du pancréas de la souris obèse semble donc vérifier l'hypothèse que le syndrome diabétique de ces animaux proviendrait plus d'une résistance des tissus à l'insuline (57-59) que d'une insuffisance d'insuline par défaut primaire de la cellule B.

La souris diabétique (DBM)

Comparé à celui de la souris obèse, le pancréas de la souris diabétique présente beaucoup plus d'anomalies morphologiques.

Sans aucun doute, la souris DBM est capable de régénérer un certain nombre de cellules B par la division de cellules préexistantes. Cependant la capacité de multiplication des cellules B semble limitée du fait que les mitoses sont relativement peu fréquentes par rapport au nombre total des cellules B et que leur activité mitotique décroît rapidement

et très tôt au cours de l'évolution du syndrome. A cela s'ajoute le fait que les cellules B se nécrosent plus fréquemment que chez les autres souris.

Dans les cellules B, l'absence d'altérations des organites cytoplasmiques responsables de la libération du produit sécrétoire (microtubules, microfilaments, membrane plasmique, membrane granulaire) semble confirmer les résultats du dosage de l'insuline immunoréactive après stimulation (56) montrant qu'il n'y a pas d'anomalie de la libération d'insuline chez la souris DBM.

En ce qui concerne la synthèse d'insuline, les cellules B des souris DBM montrent les signes d'une activité intense, particulièrement lorsqu'il s'agit de souris fortement hyperglycémiques chez lesquelles la concentration d'insuline est haute de façon permanente et n'augmente pas à la suite d'une injection de glucose. C'est chez ces dernières que l'on observe le plus fréquemment une accumulation massive du produit nouvellement synthétisé (que l'on pense être de la proinsuline) à l'intérieur des citernes ergastoplasmiques dilatées. Si cette accumulation de matériel sécrétoire semble exclure un défaut primaire de la synthèse des chaînes peptidiques de l'insuline, elle pourrait en revanche faire penser à un trouble du flux de ce matériel entre le REG et l'appareil de Golgi où se fait normalement la conversion de la proinsuline en insuline et l'élaboration des granules sécrétoires. En effet on peut imaginer qu'en cas de ralentissement de la fonction golgienne, on puisse observer une perturbation dans le flux normal REG → Golgi → membrane plasmique. Cette perturbation se manifesterait par une accumulation de matériel sécrétoire en amont du compartiment régulant le flux, compartiment qui, dans notre cas, semble être l'appareil de Golgi. Un tel blocage, soit relatif, soit absolu au niveau du Golgi, pourrait expli-

quer le fait que le transport intracellulaire d'insuline ne peut pas s'adapter continuellement à une demande accrue chez la souris DBM et conduirait à une déficience progressive en insuline.

L'étude poursuivie actuellement concernant l'effet de la cypheptadine sur les cellules B pancréatiques du rat pourrait ainsi apporter des renseignements utiles pour une meilleure compréhension de la pathogenèse du syndrome diabétique des souris DBM. En effet, les altérations morphologiques que l'on observe dans le réticulum endoplasmique granulaire après un traitement à la CPH sont du même type que celles qui affectent la souris DBM. D'autre part, des expériences préliminaires (60) sur l'incorporation de leucine tritiée dans des flots de rats traités à la CPH, montrent que le taux de proinsuline marquée est diminué de façon significative par rapport à celui des flots témoins. L'intégration de ces données biochimiques avec nos observations radioautographiques nous ont permis de conclure (61) que les changements morphologiques induits par la CPH s'accompagnent d'un ralentissement du renouvellement de la proinsuline et peut-être d'un retard de la maturation des granules sécrétoires dans l'aire golgienne des cellules B.

Le hamster chinois

Chez les animaux de parents diabétiques, la majorité des cellules B sont dégranulées (62). Chez les animaux devenus hyperglycémiques mais qui le sont encore par intermittence, la granulation est plus forte que chez les animaux contrôles du même âge (63). Chez les hamsters franchement diabétiques dont le contenu pancréatique en insuline décroît rapidement et devient virtuellement non mesurable, les cellules B sont pratiquement dépourvues de granules. A ce moment, un grand nombre de cellules B sont totalement infiltrées

de glycogène et d'autres présentent des altérations dégénératives du cytoplasme.

Les cellules B de hamster chinois diabétique semblent donc incapables de s'adapter à une demande accrue d'insuline (62,64). Une notion également intéressante établie tout d'abord sur une base purement morphologique implique une altération du fonctionnement des cellules A_2 , sécrétant le glucagon, chez les hamsters cétosiques (65). En effet, si les cellules A_2 des hamsters diabétiques non cétosiques ne présentent aucun signe de sécrétion excessive de glucagon, on trouve chez les hamsters cétosiques des cellules A_2 dégranulées et montrant tous les signes d'une synthèse intense de cette hormone.

Cette sécrétion paradoxale de glucagon pourrait être expliquée par les résultats de GRODSKY (66) démontrant "in vitro" que le glucose seul ou accompagné de différents stimuli ne cause pas seulement une détérioration de la libération d'insuline chez le hamster diabétique mais encore une réduction de l'inhibition contrôlant normalement la sécrétion du glucagon.

Ainsi le diabète génétique du hamster chinois peut être caractérisé par une insensibilité au glucose non seulement des cellules productrices d'insuline mais aussi de celles qui sécrètent le glucagon.

L' Acomys

Les particularités morphologiques du pancréas endocrine de l'Acomys, plus précisément l'abondance de granules pâles dans les cellules B, ont conduit certains chercheurs à penser que l'insuline de ces animaux pouvait être anormale structuralement et biologiquement (51). Cependant, des études biochimiques ultérieures entreprises à ce sujet (51,67,68), de

même que les résultats morphologiques rapportés dans ce travail semblent indiquer que la faculté des cellules B de synthétiser et de concentrer une insuline biologiquement compétente n'est pas altérée chez l'Acomys. Elles sont en revanche plus évocatrices d'une altération de la libération d'insuline. En effet, si la teneur du pancréas en insuline immunoréactive est normale, la phase initiale de la réponse sécrétoire d'insuline est en revanche significativement diminuée dans tous les cas. Sur des îlots isolés d'Acomys on peut montrer que la réponse est réduite non seulement en amplitude mais qu'elle survient plus tardivement (69).

Parmi les changements morphologiques constatés dans les cellules B de l'Acomys, il en est deux qui pourraient être en relation avec les troubles de la libération d'insuline. Ces changements sont un appauvrissement probable en microtubules suspecté sur la base de la faible précipitation des protéines microtubulaires par la vincristine et l'absence virtuelle de terminaisons nerveuses dans les îlots. En effet, le rôle du système microtubulaire-microfilamenteux sur la libération de l'insuline semble important (32,33) et il a été récemment suggéré que le système nerveux autonome pourrait moduler le type et l'amplitude de la réponse insulinaire à différentes stimulations, peut-être en modifiant le taux basal d'AMP cyclique. C'est dans ce contexte que notre incapacité de détecter la moindre terminaison nerveuse chez l'Acomys devient intéressante et pourrait expliquer dans une certaine mesure la diminution et peut-être encore mieux le retard des réponses sécrétoires des cellules B de l'Acomys.

Le mulot

Les deux mulots que nous avons eu l'occasion d'examiner étaient obèses et sévèrement diabétiques. Leur glucose plasmatique était élevé et leur glucosurie fort importante. Il est difficile, disposant de si peu d'animaux, d'établir une image représentative de leur syndrome diabétique.

Tout ce que l'on peut dire pour l'instant, c'est que le pancréas des mulots diabétiques n'est apparemment pas très différent de celui des autres rongeurs hyperglycémiques. Il semble qu'il y ait une légère polynésie, que les cellules B soient peu nombreuses, souvent dégranulées, et parfois envahies de dépôts importants de glycogène. Les organites cellulaires impliqués dans la synthèse, la concentration et la libération d'insuline montrent des signes d'intense activité, mais il ne semble pas qu'il y ait de blocage entre ces différentes étapes, ni d'altération spécifique à l'un ou l'autre niveau.

Il serait intéressant de continuer cette étude car de tous les rongeurs spontanément diabétiques que nous avons étudiés, les mulots sont les seuls qui ne proviennent pas d'une région désertique. Ils ont été capturés dans la campagne avoisinant Lausanne et leur comportement est étudié actuellement dans un terrarium reproduisant leur environnement normal. Enfin, il a été observé que ces animaux deviennent obèses et diabétiques seulement à certaines périodes de l'année (70).

RESUME

La compréhension des mécanismes responsables de l'homéostasie du métabolisme glucidique s'est considérablement enrichie par l'étude ultrastructurale du pancréas endocrine, particulièrement par l'étude des cellules B produisant l'insuline.

Disposant d'un grand nombre de rongeurs présentant plusieurs types de syndromes hyperglycémiques spontanés ou expérimentaux, nous avons entrepris ce travail dans le but de comparer la morphologie du pancréas endocrine de ces animaux et de localiser des modifications éventuelles du cycle sécrétoire dans les cellules B.

L'étude ultrastructurale des flots de Langerhans a été réalisée grâce aux techniques classiques de la microscopie électronique, associées parfois à des techniques particulières telles que l'histochemie, la radioautographie, le cryodécapage et la morphométrie.

Certaines altérations des flots sont communes à tous les animaux hyperglycémiques; parmi celles-ci nous avons noté :

- L'hyperplasie insulaire; elle varie énormément selon l'espèce et semble due à une augmentation du nombre de cellules B soit par division mitotique, soit par prolifération de cellules mixtes (exocrine-B).
- La présence de dépôts de glycogène intracellulaires; bien qu'accompagné de variations morphologiques des cellules B, le stockage glycogénique reflète plutôt l'état hyperglycémique qu'un changement dégénératif dans ces cellules. Le stockage est très faible chez les différentes espèces de souris, même si leur glycémie est élevée. Il est toujours

important chez l'Acomys, le hamster, le mulot et le rat hyperglycémiques.

Les organites cellulaires de la cellule B impliqués dans la synthèse (réticulum endoplasmique granulaire), la concentration (complexe de Golgi), le stockage (granules sécrétoires) et la libération de l'insuline (microtubules, microfilaments, membrane plasmique) ont été examinés chez tous les animaux hyperglycémiques.

Chez la souris obèse, les cellules B montrent tous les signes cytologiques d'une sécrétion active d'insuline, mais aucune altération morphologique.

Chez le hamster chinois, on observe une dégranulation précoce des cellules B, qui s'accompagne, chez les animaux cétosiques d'altérations dégénératives du cytoplasme.

Chez la souris DBM, nous avons noté principalement la présence de dilatations affectant le réticulum endoplasmique granulaire qui surviennent chez les animaux les plus hyperglycémiques. Ces dilatations des citernes ergastoplasmiques rappellent celles que l'on trouve dans les cellules B de rats traités à la cyproheptadine, cellules dont nous avons étudié le cycle sécrétoire par radioautographie. Dans les deux cas, il semble que ni la synthèse, ni la libération de l'insuline ne soient perturbées, mais que le transport du matériel sécrétoire entre le réticulum endoplasmique granulaire et le complexe de Golgi puisse être ralenti.

Enfin chez l'Acomys, les observations morphologiques les plus significatives sont : l'impossibilité de mettre en évidence des terminaisons nerveuses dans les îlots de Langerhans et un appauvrissement probable en microtubules dans les cellules B,

suspecté sur la base de la faible précipitation des protéines microtubulaires par la vincristine.

L'ensemble de ces données morphologiques a été condensé dans un tableau récapitulatif.

Les résultats décrits dans ce travail permettent de donner un support morphologique à l'interprétation du syndrome hyperglycémique tel qu'il a été proposé sur la base d'études biochimiques. Au cours d'une première phase de l'évolution du syndrome, l'insuline endogène serait relativement inefficace chez tous les animaux étudiés. Cette insuffisance relative d'insuline détermine alors la réponse adaptative de la cellule B, qui se manifeste essentiellement par une hyperplasie des îlots.

Chez certains animaux, l'hyperplasie insulaire est efficace et le syndrome hyperglycémique reste stable (souris obèse et certains *Acomys*). Chez d'autres animaux dont l'hyperglycémie évolue vers l'acidocétose, le pancréas paraît soit incapable de s'adapter en accroissant le nombre de cellules B fonctionnelles (hamster chinois), soit capable de répondre seulement temporairement au besoin augmenté en insuline par une hyperplasie marquée (*Acomys*) ou modérée (souris DBM) des îlots. A cette limitation initiale s'ajoutent des troubles fonctionnels du mécanisme sécrétoire de l'insuline, survenant probablement soit au niveau du transport entre le réticulum endoplasmique granulaire et le complexe de Golgi (souris DBM), soit au niveau de la libération (*Acomys*).

BIBLIOGRAPHIE

1. ORCI, L., A.E. LAMBERT, Y. KANAZAWA, M. AMHERDT, Ch. ROUILLER, and A.E. RENOLD : Morphological and biochemical studies of B-cells of fetal rat endocrine pancreas in organ culture. Evidence for (pro)insulin biosynthesis. *J. Cell Biol.* 50, 565, (1971).
2. ORCI, L., M. AMHERDT, Y. KANAZAWA, A.E. LAMBERT, and W. STAUFFACHER : Morphologic events in insulin secreting cell. Hormones pancréatiques, hormones de l'eau et des électrolytes. Colloque INSERM, 15, (1972).
3. LACY, P.E. : The pancreatic beta-cell. Structure and function. *New England J. of Med.* 276, 187, (1967).
4. LACY, P.E. : Beta-cell secretion from the standpoint of a pathobiologist. *Diabetes, the Journal of the American Diabetes Association Inc.*, 19, 895 (1970).
5. HERR, R.R., T.E. EBLE, M.E. BERGY, and H.K. JAHNKE : Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiot. Annu.* 236, (1959).
6. JUNOD, A., A.E. LAMBERT, L. ORCI, R. PICTET, A.E. GONET, and A.E. RENOLD : Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126, 201, (1967).
7. STONE, C.A., H.C. WENGER, C.T. LUDDEN, J.M. STARVORSKI, and C.A. ROSS : Antiserotonin-antihistaminic properties of cyproheptadine. *J. Pharm. Exp. Ther.* 131, 73, (1961).
8. WOLD, J.S., D.S. LONGNECKER, and L.J. FISCHER : Species dependent pancreatic islet toxicity produced by cyproheptadine : alterations in beta-cell structure and function. *Toxic. and Appl. Pharmacol.* 19, 188, (1971).
9. LONGNECKER, D.S., J.S. WOLD, and L.J. FISCHER : Ultrastructural study of alterations in beta-cells of pancreatic islets from cyproheptadine-treated rats. *Diabetes*, 21, 71, (1972).

10. LACY, P.E., and M. KOSTIANOVSKY : Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16, 35, (1967).
11. BARKA, T., and P.J. ANDERSON : Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* 10, 741, (1962).
12. GRAHAM, R.C., and M.J. KARNOVSKY : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14, 291, (1966).
13. MOOR, H., and K. MÜHLETHALER : Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.* 17, 609, (1963).
14. MCOR, H., K. MÜHLETHALER, H. WALDNER, and A. FREY-WYSSLING : New freezing ultramicrotomes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10, 1, (1961).
15. WEIBEL, E.R. : Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. of Cytol.* 26, 235, (1969).
16. CARO, L.G., and R.P. VAN TUBERGEN : High resolution autoradiography. I. Methods. *J. Cell Biol.* 15, 173, (1962).
17. GONET, A.E., W. STAUFFACHER, R. PICTET, and A.E. RENOLD : Obesity and diabetes mellitus with striking congenital hyperplasia of the islets of Langerhans in Spiny mice (*Acomys cahirinus*). I. Histological findings and preliminary metabolic observations. *Diabetologia* 1, 162, (1965).
18. GUTMAN, A., M. HASIN, and E. SHAFRIR : Adaptive responses in enzyme activities of Israeli Spiny mice (*Acomys cahirinus*). *Isr. J. Med. Sci.* 8, 364, (1972).
19. LIKE, A.A., and W.L. CHICK : Mitotic division in pancreatic beta-cells. *Science* 163, 941, (1969).
20. LIKE, A.A., and W.L. CHICK : Studies in the diabetic mutant mouse : II. Electron microscopy of pancreatic islets. *Diabetologia* 6, 216, (1970).
21. PICTET, R., et A. GONET : Cellules mixtes (exocrines et endocrines) dans le pancréas de la souris à piquants *Acomys cahirinus*. *C.R. Acad. Sc. Paris* 262, 1123, (1966).

22. ORCI, L., C. RUFENER, R. PICTET, A.E. RENOLD and Ch. ROUILLER : Present state of the evidence for mixed endocrine and exocrine pancreatic cells in Spiny mice. In: the structure and metabolism of the pancreatic islets. Eds. S. Falkmer, B. Hellman and I.B. Täljedal, Pergamon Press, Oxford and New York, 1970. Wenner-Gren Symp. 16, 37, (1970).
23. VOLK, B.W., S.S. LAZARUS, and K.F. WELLMANN : Beta-cells structure in latent and chronic diabetes of the rabbit. Diabetes 14, 792, (1965).
24. DUFF, G.L. and W.E. TORESON : Prevention and reversal despite hyperglycemia of glycogen infiltration ("hydropic degeneration") in the pancreas in alloxan diabetes in the rabbit. Endocrinology 48, 298, (1951).
25. ESTERHUIZEN, A.C., T.L.B. SPRIGGS, and J.D. LEVER : Nature of islet-cell innervation in the cat pancreas. Diabetes 17, 33, (1968).
26. ORCI, L., A. PERRELET, M. RAVAZZOLA, F. MALAISSE-LAGAE, and A.E. RENOLD : A specialized membrane junction between nerve endings and B-cells in islets of Langerhans. Europ. J. Clin. Invest. 3, 443 (1973).
27. PORTE, D., and R.H. WILLIAMS : Inhibition of insulin release by norepinephrine in man. Science 152, 1248, (1966).
28. KANETO, A., K. KOSAKA, and K. NAKAO : Effects of stimulation of the vagus nerve on insulin secretion. Endocrinology 80, 530, (1967).
29. NELSON, N.C., W.G. BLACKARD, J.C. COCCHIARA, and J.A. LABAT : Influence of the vagus nerve on pancreatic insulin secretion. Diabetes 16, 852, (1967).
30. LACY, P.E., S.L. HOWELL, D.A. YOUNG, and C.J. FINK : New hypothesis of insulin secretion. Nature, London, 219, 1177, (1968).
31. ORCI, L., W. STAUFFACHER, D. BEAVEN, A.E. LAMBERT, A.E. RENOLD, and Ch. ROUILLER : Ultrastructural events associated with the action of tolbutamide and glybenclamide on pancreatic B-cells in vivo and in vitro. Acta Diabet. Lat. 6, (Suppl. 1), 271, (1969).

32. ORCI, L., K.H. GABBAY, and W.J. MALAISSE : Pancreatic beta-cell web : its possible role in insulin secretion. *Science* 175, 1128, (1972).
33. MALAISSE, W.J., D.L. HAGER, and L. ORCI : The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. IX. The participation of the beta-cell web. *Diabetes* 21, (Suppl. 2), 594, (1972).
34. MALAISSE-LAGAE, F., M.H. GREIDER, W.J. MALAISSE, and P.E. LACY : The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. IV. The effect of vincristine and deuterium on the microtubular system of the pancreatic beta-cell. *J. Cell Biol.* 49, 530, (1971).
35. HOWELL, S.L., M. KOSTIANOVSKY, and P.E. LACY : Beta granule formation in isolated islets of Langerhans. A study by electron microscopic radioautography. *J. Cell Biol.* 42, 695, (1969).
36. ORCI, L., M. AMHERDT, Y. KANAZAWA, and A.E. LAMBERT : Insulin biosynthesis : electron microscopic radioautography in organ culture of fetal rat pancreas. *Diabetologia* 6, 642, (1970).
37. KAWANISHI, H. : Electron microscopic studies on the secretory mechanism of pancreatic islet cells, with particular reference to beta-cells. II. Secretion of beta granules in islets of Langerhans, particularly in association with intracellular reactive zinc under normal conditions, during prolonged starvation, and after administration of dithizone in rabbits. *Endocr. Jap.* 13, 384, (1966).
38. LIKE, A.A., and E. MIKI : Diabetic syndrome in sand rats. IV. Morphologic changes in islet tissue. *Diabetologia* 3, 143, (1967).
39. BENSCH, K.G., and S.E. MALAWISTA : Microtubular crystals in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 40, 95, (1969).
40. MARANTZ, R., M. VENTILLA, M.L. SHELSKY : Vinblastine-induced precipitation of microtubule protein. *Science* 165, 498, (1969).
41. NEVE, P., C. WILLEMS, and J.E. DUMONT : Involvement of the microtubule-microfilament system in thyroid secretion. *Exper. Cell Res.* 63, 457, (1970).

42. LACY, P.E., and W.S. HARTROFT : Electron microscopy of the islets of Langerhans. Ann. N.Y. Acad. Sci., 82, 287, (1959).
43. ORCI, L., M. AMHERDT, F. MALAISSE-LAGAE, Ch. ROUILLER, and A.E. RENOLD : Insulin release by emiocytosis : demonstration with freeze-etching technique. Science 179, 82, (1973).
44. ORCI, L., F. MALAISSE-LAGAE, M. RAVAZZOLA, M. AMHERDT, and A.E. RENOLD : Exocytosis-endocytosis coupling in the pancreatic beta-cell. Science 181, 561, (1973).
45. BRANTON, D. : Fracture faces of frozen membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 55, 1048, (1966).
46. BRANTON, D. : Freeze-etching studies of membrane structure. Philosophical Transactions of the Royal Society (London), 261, 133, (1971).
47. PINTO DA SILVA, P. : Translational mobility of the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghosts. - pH dependent, reversible aggregation. J. Cell Biol. 53, 777, (1972).
48. COOPERSTEIN, S.J., and A. LAZAROW : Distribution of alloxan-C14 in islet and other tissues of the toadfish (Opsanus tau). Amer. J. Physiol. 207, 423, (1964).
49. WATKINS, D., S.J. COOPERSTEIN and A. LAZAROW : Effect of alloxan on permeability of pancreatic islet tissue in vitro. Amer. J. Physiol. 207, 436, (1964).
50. ORCI, L., M. AMHERDT, W. STAUFFACHER, A.A. LIKE, Ch. ROUILLER, and A.E. RENOLD : Structural changes in membranes of beta-cells exposed to alloxan and streptozotocin demonstrated by freeze-etching. Diabetes 21, (Suppl. 1) 326, (1972).
51. STAUFFACHER, W., L. ORCI, D.P. CAMERON, I.M. BURR, and A.E. RENOLD : Spontaneous hyperglycemia and/or obesity in laboratory rodents : an example of the possible usefulness of animal disease models with both genetic and environmental components. Ed. E.B. Astwood. Recent Progr. Horm. Res. 27, 41, (1971).
52. STAUFFACHER, W., L. ORCI, M. AMHERDT, I.M. BURR, L. BALANT, E.R. FROESCH, and A.E. RENOLD : Metabolic state, pancreatic insulin content and B-cell morphology of normoglycemic Spiny mice (Acomys cahirinus) : indications for an impairment of insulin secretion. Diabetologia 6, 330, (1970).

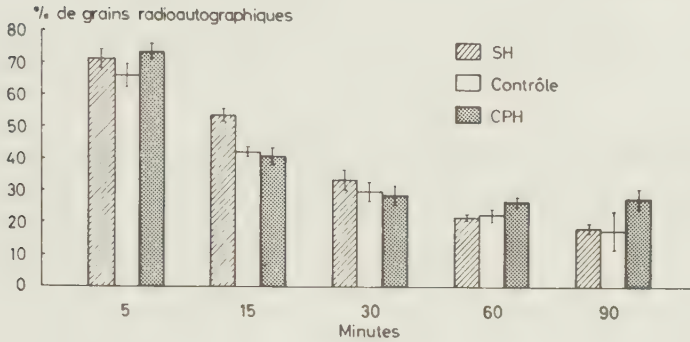
53. RENOLD, A.E., D.P. CAMERON, M. AMHERDT, W. STAUFFACHER, E. MARLISS, L. ORCI, and Ch. ROUILLER : Endocrine-metabolic anomalies in rodents with hyperglycemic syndromes of hereditary and/or environmental origin. *Isr. J. Med. Sci.* 8, 189, (1972).
54. CAMERON, D.P., M. AMHERDT, L. ORCI, R. DE PEYER, and W. STAUFFACHER : Biochemical and morphological studies of immunoreactive insulin secretion in spontaneous and acquired obesity and/or hyperglycemia in rodents. *Acta diabet. lat.*, 9, (Suppl. 1), 89, (1972).
55. CAMERON, D.P., W. STAUFFACHER, L. ORCI, M. AMHERDT, and A.E. RENOLD : Defective immunoreactive insulin secretion in the *Acomys cahirinus*. *Diabetes* 21, 1060, (1972).
56. CAMERON, D.P., W. STAUFFACHER, M. AMHERDT, L. ORCI, and A.E. RENOLD : Kinetics of immunoreactive release in obese hyperglycemic laboratory rodents. *Endocrinology* 92, 257, (1973).
57. MAYER, J., R.E. RUSSEL, M.W. BATES, and M.M. DICKIE : Metabolic nutritional and endocrine studies of the hereditary obesity-diabetes syndrome of mice and mechanism of its development. *Metabolism* 2, 9, (1953).
58. BATT, R., and R. MIALHE : Insulin resistance of the inherently obese mouse-obob. *Nature* 212, 289, (1966).
59. WESTMAN, S. : Development of the obese-hyperglycaemic syndrome in mice. *Diabetologia* 4, 141, (1968).
60. MALDONATO, A. : Observations non publiées.
61. AMHERDT, M., F. HUMBERT, A. RABINOVITCH, L. ORCI, and A.E. RENOLD : Alteration of the insulin-secretory process by cyproheptadine : a correlative ultrastructural and biochemical study. VIIIth Congress of the Intern. Diabetes Fed. Bruxelles juillet 1973. *Excerpta Medica* 280, 1, (1973).
62. CARPENTER, A.M., G.C. GERRITSEN, W.E. DULIN, and A. LAZAROW : Islet and beta-cell volumes in offspring of severely diabetic (ketotic) Chinese hamsters. *Diabetologia* 6, 168, (1970).
63. MALAISSE, W.J., F. MALAISSE-LAGAE, G.C. GERRITSEN, W.E. DULIN, and P.H. WRIGHT : Insulin secretion in vitro by the pancreas of the Chinese hamster. *Diabetologia* 3, 109, (1967).

64. CHANG, A.Y., and D.I. SCHNEIDER : Metabolic abnormalities in the pancreatic islets and livers of the diabetic Chinese hamster. *Diabetologia* 6, 180, (1970).
65. ORCI, L., W. STAUFFACHER, W.È. DULIN, A.E. RENOLD, and Ch. ROUILLER : Ultrastructural changes in A-cells exposed to diabetic hyperglycaemia. Observations made on pancreas of Chinese hamsters. *Diabetologia* 6, 199, (1970)
66. FRANKEL, B.J., J.E. GERICH, R.E. FANSKA, and G.M. GRODSKY : Subnormal insulin and excessive glucagon release from in vitro perfused pancreases of nonobese, genetically diabetic Chinese hamsters. *Diabetes*, 22, (Suppl. 1), 307, (1973).
67. BURR, I.M., L. BALANT, W. STAUFFACHER, and A.E. RENOLD : Micro gel electrophoresis modification for dilute (protein) solutions. *Anal. Biochem.* 35, 82, (1970).
68. BALANT, L., I.M. BURR, W. STAUFFACHER, D. CAMERON, R. HUMBEL, and A.E. RENOLD : Insulin of Spiny mice (*Acomys cahirinus*). Partial characterization and evidence for two insulins. *Endocrinology* 88, 517, (1971).
69. RENOLD, A.E., A. RABINOVITCH, C.B. WOLLHEIM, M. KIKUCHI, A.H. GUTZEIT, M. AMHERDT, F. MALAISSE-LAGAE and L. ORCI : Spontaneous and experimental diabetic syndromes in animals. A re-evaluation of their usefulness for approaching the physiopathology of diabetes. The 5th Claude Bernard Lecture of the European Association for the Study of Diabetes, presented July 15, 1973. *Excerpta Medica*. In press.
70. SCHENK, F., and M. DOLIVO : Observations non publiées.

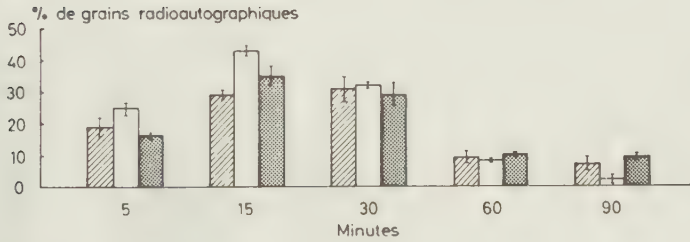
FIGURE I

Distribution des grains radioautographiques sur
le Réticulum endoplasmique granulaire
le complexe de Golgi et sur les granules sécrétoires

Réticulum endoplasmique granulaire



Complexe de Golgi



Granules sécrétoires

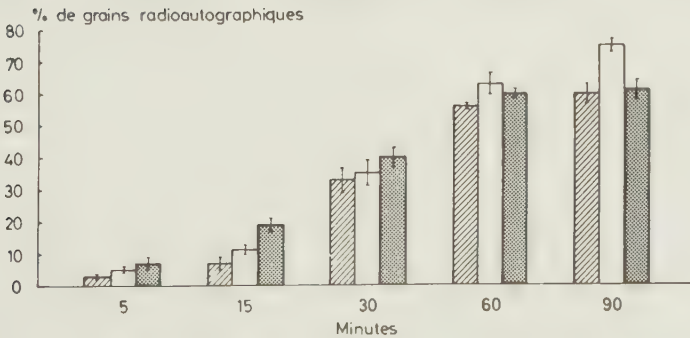


FIGURE II

Distribution des grains radioautographiques sur
les granules sécrétoires associés (partie claire)
ou non (partie foncée) au complexe de Golgi

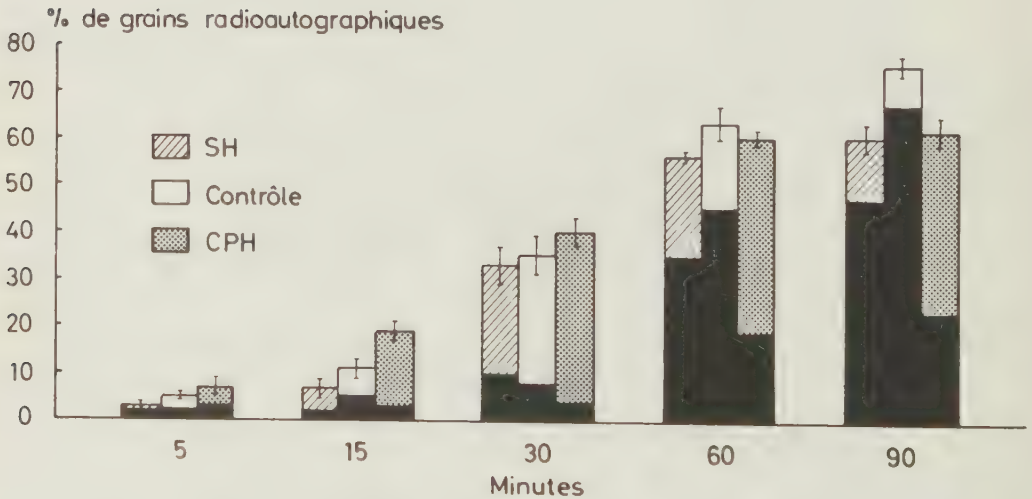


FIGURE III

Ilots isolés incubés 180 min
en présence de vincristine (10^{-5} M)

Nombre de cellules B contenant des cristaux
exprimé en % du nombre total de cellules B observées

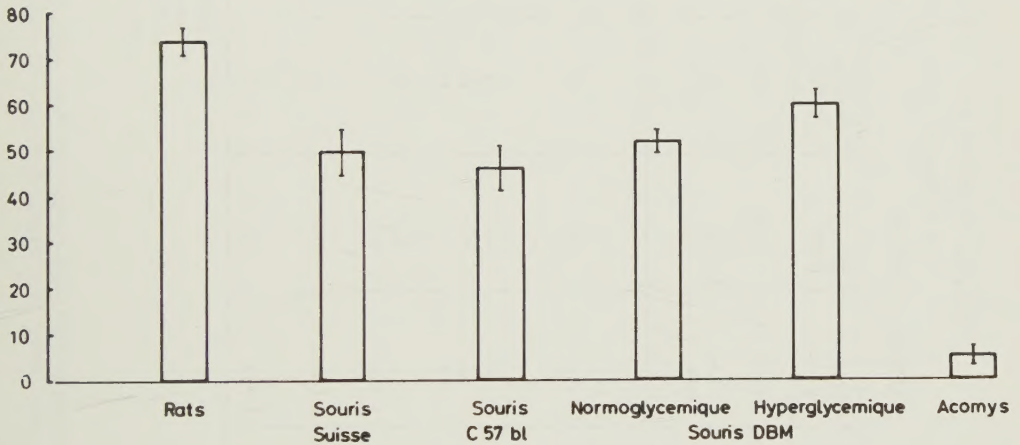


TABLEAU RECAPITULATIF DES MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALES
DU PANCREAS ENDOCRINE DE RONGEURS AU COURS DU
DIABETE SPONTANE ET DU DIABETE EXPERIMENTAL

ACOMYS	SOURIS DEM	SOURIS OBOB	HAMSTER CHINOIS	MULOT	STREPT. RAT	CPH RAT
+++ - +++ - +++	(+)* + (+) (+) +	++ - (+) +	(+)* - - +++ +	+(?) - - +++ +	- - +++ ++ +	- - (+) ++ +
(+) + + - ++ +++ + ++ ++ ++ ++ ++ (+)	++ ++ - + (+) + - - - + - N N N	- ++ - - ++ ++ - N N N (+) (+)	- ++ + - ++ ++ - N N N (+) (+)	- ++ - - - (?) + + - N (+) N (+)	+ ++ - - + + + + + + + + N (+) - - +	(+) ++ - +++ ++ ++ +++ - N N (+) - - (+)
<u>CELLULE B</u>						
Hyperplasie des flots						
Mitoses cellules B						
Cellules mixtes						
Dépôts de glycogène						
Terminalisons nerveuses						
<u>INCLUSIONS CYTOPLASMIQUES</u>						
Fréquence nécroses						
Développement REG						
Altérations REG :						
-empreintes digitales						
-dilatation citernes						
-laque insulinique						
Développement Golgi						
Granulation						
Altération granules						
Fréquence lysosomes						
Fréquence microtubules						
<u>INCLUSIONS CYTOPLASMIQUES</u>						
Fréquence des cils						
Corps multibubulaires						
Particules virales						
Fibres intranucléaires						

(+)* = transitoire
(+) = rare
+ = évident
++ = marqué
+++ = très marqué

N = normal
- = non observé
+ = augmenté
↓ = diminué

Les termes choisis pour caractériser les symboles sont employés soit avec une signification d'intensité soit avec une signification de nombre.

